

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 169**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/16** (2006.01)  
**A01K 67/027** (2006.01)  
**C12N 15/87** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C12N 5/073** (2010.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2005 E 14163635 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2018 EP 2767161**

54 Título: **Método para generar un animal no humano homocigótico para una modificación genética**

30 Prioridad:

**19.10.2004 US 619999 P**  
**10.06.2005 US 689192 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.05.2018**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**  
**(100.0%)**  
**777 Old Saw Mill River Road**  
**Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**POUEYMIROU, WILLIAM;**  
**DECHIARA, THOMAS M.;**  
**AUERBACH, WOJTEK;**  
**FRENDEWEY, DAVID y**  
**VALENZUELA, DAVID M.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 667 169 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método para generar un animal no humano homocigótico para una modificación genética

**5 Antecedentes****Campo de la invención**

10 La invención se refiere a métodos mejorados para generar un animal homocigótico para una modificación genética. Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos para aumentar la eficiencia de generación de animales capaces de transmitir una modificación deseada a su descendencia posterior, para generar animales que tienen una alta contribución de material genético de células donantes, y para aumentar la eficiencia y disminuir el tiempo necesario para generar animales homocigóticos que porten la modificación genética deseada.

**15 Descripción de la técnica relacionada**

Se conocen en la técnica métodos para modificar células donantes eucarióticas. Véase, por ejemplo la Patente de los Estados Unidos Nº 6.586.251. También se conocen en la técnica métodos para generar animales transgénicos. En Yagi et al. (1993) Analytical Biochemistry 214: 70-76 se describe un método propuesto para mejorar la eficiencia en la generación de animales capaces de transmitir una modificación deseada en células ES TT2.

**Breve resumen de la invención**

25 La invención se basa en parte en la realización de que la introducción de una célula modificada en un embrión huésped en estadio temprano aumenta sustancialmente el material genético y la contribución celular de las células donantes al embrión huésped, de tal forma que el animal producido tiene una fracción incrementada de células del donante y por tanto tienen una probabilidad aumentada de transmitir la modificación a través de la línea germinal. Además, los métodos de la invención permiten emplear un intervalo más amplio de células donantes de lo que se practicaba con los métodos de la técnica anterior. Los métodos de la presente invención por tanto reducen el número de animales y cruzamientos necesarios para generar un animal homocigótico para una modificación.

35 La invención proporciona un método para generar un embrión de ratón que comprende (a) introducir una célula donante de ratón en un embrión huésped de ratón en pre-mórula, en donde las células donantes comprenden células ES o células tipo ES procedentes de un ratón endógamo; y (b) cultivar el embrión de ratón huésped en pre-mórula de (a) hasta el estadio de blastocisto, en donde al menos un 90 % de las células de un ratón que se desarrolla a partir del blastocisto se derivan de las células donantes.

40 La invención proporciona adicionalmente un cultivo, que comprende: a) un embrión en estadio de premórula de ratón quimérico diploide, en el que el embrión de ratón quimérico comprende una célula ES de ratón donante modificado genéticamente y en el que un ratón generado a partir del embrión de ratón quimérico tiene al menos 90 % de contribución celular de la célula ES donante; b) un primer componente que comprende un primer medio adecuado para cultivar una célula ES de ratón; y c) un segundo componente que comprende un segundo medio que comprende una proteína Wnt 3 o Wnt3a de la familia Wnt producida por células L de ratón.

45 La invención proporciona además un método para realizar el cultivo de la invención, que comprende: a) sembrar en placas células L de ratón que expresan y secretan Wnt3 o Wnt3a, una proteína de la familia Wnt en un medio adecuado para cultivar células L de ratón; b) cultivar las células L de ratón de la etapa (a) hasta su confluencia; c) recoger las células L de la etapa (b) y volver a sembrar aproximadamente 10 % de las células L recogidas y cultivar las células L que se han vuelto a sembrar en el medio adecuado para cultivar células L de ratón de la etapa (a) para producir un medio acondicionado por células L de ratón; d) recoger el medio acondicionado de (c); e) combinar el medio recogido de (d) con un volumen aproximadamente igual de un medio de cultivo de embrión de ratón adecuado para cultivar una célula ES de ratón que comprende KSOM de reemplazo de suero y aminoácidos no esenciales; y f) cultivar un embrión en estadio de premórula de ratón quimérico diploide en el medio combinado de (e), en donde el embrión de ratón quimérico comprende una célula ES de ratón donante modificada genéticamente y en donde un ratón generado a partir del embrión de ratón quimérico tiene al menos 90 % de contribución celular de la célula ES donante.

60 La invención proporciona adicionalmente un método para preparar un ratón a partir de una célula ES donante que comprende: (a) cultivar un embrión hospedador en estadio de premórula que comprende una célula ES donante de una cepa endógama en medio de cultivo hasta estadio de blastocisto en un medio, en el que el medio comprende: (i) un componente que comprende un medio adecuado para cultivar una célula ES de ratón; y (ii) un componente que comprende un medio que comprende Wnt3 o Wnt3a producido por células L de ratón; (b) transferir el embrión en estadio de blastocisto a una madre subrogada; y (c) gestar el embrión en estadio de blastocisto en la madre subrogada, en el que un ratón generado a partir del embrión en estadio de blastocisto tiene al menos 90 % de contribución celular de la célula ES donante.

65 La invención proporciona además un método para preparar un ratón de una célula ES donante que comprende: (a)

cultivar un embrión huésped en estadio de premórula que comprende una célula ES donante de una cepa endógama en medio de cultivo hasta estado de blastocisto en un medio de cultivo de embrión; (b) transferir el embrión en estadio de blastocisto a una madre subrogada; y (c) gestar el embrión en estadio de blastocisto en la madre subrogada, en el que un ratón generado a partir del embrión en estadio de blastocisto tiene al menos 90 % de contribución celular de la célula ES donante.

En un primer aspecto, se describe en el presente documento un método para generar un mamífero modificado, que comprende: (a) introducir una célula donante eucariótica en un embrión en estadio temprano; y (b) introducir el embrión de (a) en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un mamífero modificado. El embrión en estadio temprano es una célula en estadio pre-mórula. En una realización más específica, el embrión en estadio temprano es un embrión de 8 células. El embrión en estadio temprano puede derivarse de cualquier cepa. En una realización, se emplea un embrión endógamo, por ejemplo C57BL/6, como embrión huésped. En otra realización, se emplea un embrión exógamo, por ejemplo Swiss Webster, como embrión huésped.

La célula donante eucariótica es una célula madre. Más específicamente, la célula madre es una célula madre embrionaria (ES) o una célula de tipo ES. Pueden emplearse células ES de cualquier línea celular ES adecuadas en el método descrito en el presente documento. En una realización, la célula ES se deriva de una cepa endógama, por ejemplo, 129, C57BL/6 o BalbC. En otra realización, la célula ES se deriva de una cepa híbrida, por ejemplo, C57BL/6 x 129. En una realización específica, la célula es una célula ES de ratón. Sin embargo, el método descrito en el presente documento, puede practicarse con células derivadas de otros mamíferos, por ejemplo, una célula ES o tipo ES de rata. En una realización, la célula ES o tipo ES es una célula modificada que comprende una modificación genética. En una realización más específica, la modificación puede surgir espontáneamente, puede ser al azar, puede ser el resultado de una manipulación experimental, por ejemplo, mediante la introducción de un ácido nucleico exógeno. Se puede introducir un ácido nucleico exógeno mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por recombinación homóloga.

En un segundo aspecto, en el presente documento se describe un método para generar un mamífero homocigótico para una modificación genética, que comprende: (a) introducir una célula femenina donante eucariótica en un embrión huésped en estadio temprano, en donde la célula donante eucariótica es heterocigótica para la modificación genética; (b) mantener al embrión de (a) en cultivo para desarrollo posterior; (c) introducir al embrión de (b) en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un mamífero hembra modificado; (a') introducir una célula masculina donante eucariótica en un embrión huésped en estadio temprano, en donde la célula donante eucariótica es heterocigótica para la modificación genética; (b') mantener al embrión de (a') en cultivo para desarrollo posterior; (c') introducir el embrión de (b') en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un mamífero macho modificado; y (d) cruzar al macho y hembra sexualmente maduros de (c y c'), en donde se genera un mamífero homocigótico para la modificación genética.

En un aspecto, la célula femenina donante eucariótica de la etapa (a) se deriva de la misma línea celular que la célula masculina donante eucariótica de la etapa (a'). En un aspecto más específico, la célula femenina donante eucariótica de la etapa (a) es una célula XO y el mamífero hembra modificado de la etapa (c) es un mamífero XO.

La célula donante eucariótica masculina o femenina es una célula madre, preferentemente una célula ES o tipo ES heterocigótica. En un aspecto, la célula ES heterocigótica se genera mediante (i) la obtención de un fragmento genómico elongado clonado que contiene una secuencia de interés de ADN; (ii) el uso de recombinación homóloga bacteriana para modificar genéticamente el fragmento genómico elongado clonado de (i) para crear un vector de elongación orientado para usarlo en células eucarióticas donantes (LTVEC, o vector de elongación orientado); (iii) la introducción del LTVEC de (ii) en las células donantes eucarióticas para modificar un gen endógeno o locus cromosómico en las células donantes eucarióticas; y (iv) emplear un ensayo cuantitativo para detectar la modificación de alelos en las células donantes eucarióticas de (iii) para identificar a aquellas células donantes eucarióticas en las cuales el gen endógeno o locus cromosómico se ha modificado genéticamente.

En varios aspectos, las condiciones de cultivo de la etapa (b) y/o (b') permiten al embrión desarrollarse hasta un estadio post-mórula o posterior. En un aspecto, las condiciones de cultivo de la etapa (b) y/o (b') se proporcionan con un medio de cultivo condicionado por un factor de crecimiento. En un aspecto preferido, el factor de crecimiento es una proteína de la familia de Wnt. En un aspecto, la proteína Wnt se añade directamente al medio de cultivo. En otro aspecto, la proteína Wnt se produce por células L de ratón. En otro aspecto más, el medio de cultivo comprende un factor inhibidor de leucemia (LIF).

En un aspecto específico, un embrión en estadio de blastocisto de (b) y/o (b') se introduce en una madre subrogada para la gestación y desarrollo posterior.

La célula donante eucariótica puede introducirse en un embrión en estadio temprano mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización, la célula donante eucariótica se introduce bajo la zona pelúcida del embrión en estadio temprano. Otras metodologías incluyen la retirada de la membrana de la zona pelúcida. En una realización más específica, la célula donante eucariótica puede introducirse bajo la zona pelúcida mediante inyección u otros métodos que creen una abertura en la zona pelúcida. En una realización específica, se genera una abertura

en la zona pelúcida mediante un láser. En una realización, el láser comprende un láser diodo infrarrojo en estado sólido. En otra realización, la célula donante eucariótica se introduce en el embrión huésped mediante métodos de fusión celular.

5 En un aspecto, se cría en la etapa (d) un mamífero modificado que comprende más del 90 % de células derivadas de las células donantes. En un aspecto preferido, el mamífero modificado comprende más del 95 % de células derivadas de las células donantes. Más preferentemente, el mamífero modificado comprende el 100 % de células derivadas de las donantes.

10 En un tercer aspecto, se describe en el presente documento un método para generar un embrión homocigótico para una modificación genética, que comprende: (a) introducir una célula donante eucariótica femenina en un embrión huésped en estadio temprano, en donde la célula donante eucariótica femenina es heterocigótica para la modificación genética; (b) mantener al embrión de (a) en cultivo para desarrollo posterior; (c) introducir el embrión de (b) en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un mamífero hembra modificado; (a') introducir una célula donante eucariótica masculina en un embrión huésped en estadio temprano, en donde la célula donante eucariótica masculina es heterocigótica para la modificación genética; (b') mantener el embrión de (a') en cultivo para desarrollo posterior; (c') introducir el embrión de (b') en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un mamífero macho modificado; y (d) cruzar al mamífero macho modificado con el mamífero hembra modificado de (c y c'), en donde se genera un embrión homocigótico para la modificación genética.

20 En un cuarto aspecto, se describe en el presente documento un método para generar un mamífero homocigótico para una modificación genética, que comprende: (a) introducir una célula donante eucariótica en un embrión en estadio temprano, en donde la célula donante eucariótica es homocigótica para la modificación genética; (b) mantener al embrión de (a) en cultivo para desarrollo posterior; (c) introducir el embrión de (b) en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un mamífero homocigótico para la modificación genética.

25 En un aspecto, el método para generar la célula donante eucariótica homocigótica para la modificación genética comprende una conversión génica, dirigiendo ambos alelos del mismo gen, o dirigiendo tanto un gen ligado a X- o a Y- en una célula ES masculina.

30 En un quinto aspecto, se describe en el presente documento un método para generar un embrión homocigótico para una modificación genética que comprende: (a) introducir una célula donante eucariótica en un embrión en estadio temprano, en donde la célula donante eucariótica es homocigótica para la modificación genética; y (b) cultivar el embrión en estadio temprano de la etapa (a), en donde se genera un embrión homocigótico para la modificación genética.

35 En un sexto aspecto se describe en el presente documento un método para aumentar la contribución relativa de material genético procedente de una célula donante eucariótica a un embrión huésped, que comprende: (a) introducir una célula donante eucariótica en un embrión en estadio temprano; y (b) cultivar el embrión en estadio temprano de la etapa (a) en condiciones que permiten al embrión desarrollarse hasta un estadio post-mórula o posterior.

40 En un aspecto, las condiciones de cultivo de la etapa (b) permiten al embrión desarrollarse hasta el estadio de blastocisto. En otro aspecto, las condiciones de cultivo de la etapa (b) permiten al embrión desarrollarse hasta una gástrula o posterior. En varios aspectos, las condiciones de cultivo de la etapa (b) permiten al embrión desarrollarse hasta un estadio post-mórula o posterior. En un aspecto, las condiciones de cultivo de la etapa (b) se proporcionan con un medio condicionado por un factor de crecimiento. En una realización preferida, el factor de crecimiento es una proteína de la familia de Wnt. En un aspecto, la proteína Wnt se añade al medio de cultivo directamente. En otro aspecto, la proteína Wnt se introduce por células L. En otro aspecto más, el medio de cultivo comprende además un factor inhibidor de leucemia (LIF).

45 En un séptimo aspecto, en el presente documento se describe un método para generar un mamífero que tiene una contribución relativa aumentada de material genético de una célula donante eucariótica a un embrión huésped, que comprende: (a) introducir una célula eucariótica donante en un embrión en estadio temprano; (b) cultivar el embrión en estadio temprano de la etapa (a) en condiciones que permiten al embrión desarrollarse a un estadio de post-mórula o posterior; y (c) introducir el embrión de (b) en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un mamífero que tiene una fracción aumentada de células procedentes de la célula eucariótica donante.

50 En un octavo aspecto, se describe en el presente documento un método para generar un mamífero capaz de transmitir una modificación genética, que comprende: (a) introducir una célula donante eucariótica en un embrión en estadio temprano, en donde la célula donante eucariótica porta una modificación genética; (b) cultivar el embrión en estadio temprano de la etapa (a) en condiciones que permitan al embrión desarrollarse hasta un estadio post-mórula o posterior; y (c) introducir el embrión de (b) en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un mamífero capaz de transmitir la modificación genética.

55 En un noveno aspecto, se describe en el presente documento un mamífero modificado genéticamente generado

mediante un método descrito en el presente documento. En un aspecto preferido, el 90 % o más de las células del mamífero son células derivadas de la célula donante; más preferentemente, el 95 % o más de las células del mamífero son células derivadas de la célula donante; aún más preferentemente, el 99 % o más de las células del mamífero son células derivadas de la célula donante. En una realización, el 100 % de las células del mamífero son células derivadas de la célula donante.

En un décimo aspecto se describe en el presente documento un embrión modificado genéticamente generado mediante un método de la invención. En un aspecto preferido, el 90 % o más de las células del embrión son células derivadas de la célula donante; más preferentemente, el 95 % o más de las células son células derivadas de la célula donante; aún más preferentemente, el 99 % o más de las células son células derivadas de la célula donante. En un aspecto, el 100 % de las células del embrión son células derivadas de la célula donante.

En un undécimo aspecto se describe en el presente documento un medio de cultivo para mantener y/o desarrollar un embrión en estadio temprano, en donde el medio de cultivo comprende un factor de crecimiento.

En un aspecto, el factor de crecimiento es una proteína de la familia de Wnt. La proteína de la familia de Wnt se selecciona del grupo que consiste en Wnt1, Wnt3a, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt4, Wnt5a, Wnt6, Wnt7a, Wnt8a, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11 y Wnt16. En una realización preferida, la proteína Wnt es Wnt3a. En un aspecto, la proteína Wnt es una proteína recombinante. En otro aspecto, el medio de cultivo se condiciona por células L de ratón productoras de Wnt.

En un aspecto, el medio de cultivo además comprende un agente de mantenimiento. En un aspecto, el agente de mantenimiento es un factor de inhibición de leucemia (LIF).

Otros objetos y ventajas serán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

### Descripción detallada

Antes de describir los métodos, constructos y animales transgénicos descritos en el presente documento, debe entenderse que la presente divulgación no se limita a los métodos, constructos, animales transgénicos y condiciones experimentales descritas, ya que todos pueden variar. También debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares, y no se pretende que sean limitantes, ya que el alcance de la presente invención se limitará únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Tal como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "uno" y "el", "la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, por ejemplo, "una célula" incluye una pluralidad de células. Por tanto, por ejemplo, una referencia a "un método" incluye uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o las cuales sean evidentes para aquellos expertos en la técnica al leer esta divulgación.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos empleados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden emplear cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento, en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos, constructos y materiales preferidos se describen a continuación.

### Definiciones

El término "célula madre embrioide tipo ES" incluye una célula la cual, tras ser introducida en un embrión, puede contribuir en cualquier tejido del embrión en desarrollo.

Los términos "contribución aumentada", "mayor porcentaje relativo" y similares, incluyen una contribución de material genético mejorada de una célula donante eucariótica a un organismo resultante del desarrollo posterior de un embrión huésped modificado en estadio temprano. El método de la invención proporciona medios de aumentar la probabilidad de que las células introducidas en el embrión huésped contribuyan a todos los tejidos, incluyendo los tejidos de la línea germinal, del animal generado.

El término "knock-out génico" tal como se emplea en el presente documento significa una modificación genética resultante de la interrupción de la información genética codificada en un locus cromosómico. Por "knock-in génico" tal como se emplea en el presente documento se entiende una modificación genética resultante de un reemplazo de información genética codificada en un locus cromosómico con una secuencia de ADN distinta o la inserción de información genética exógena en un locus cromosómico. Por "animal knock-out" tal como se emplea en el presente documento se entiende un animal en el cual una proporción significativa de las células del animal portan un knock-out génico. Por "animal knock-in" tal como se emplea en el presente documento se entiende un animal en que una proporción significativa de las células del animal portan knock-in génico.

## Descripción general

Uno de los componentes deseados de un estudio con animales transgénicos es generar un animal transgénico modificado genéticamente capaz de transmitir la modificación genética a su progenie, es decir, un animal transgénico que comprende la modificación genética en su línea germinal. Los métodos actuales para crear tales animales transgénicos con capacidad de transmisión tienden a ser ineficientes en términos de recursos y tiempo empleado. Por ejemplo, para generar un animal transgénico modificado genéticamente capaz de transmitir la modificación genética a su progenie, se inyecta una célula ES modificada heterocigótica para una modificación genética deseada en un embrión blastocístico receptor, y el embrión receptor se implanta en una madre subrogada para la gestación y alumbramiento de la progenie transgénica. La progenie transgénica resultante es quimérica ya que algunos de los tejidos de la progenie se derivan de las células ES inyectadas mientras que otros tejidos de la progenie se derivan de las células procedentes del embrión receptor. Debido a este quimerismo, las células ES inyectadas que comprenden la modificación genética pueden o no formar tejidos de la línea germinal en la progenie y ser capaces de transmitir la modificación genética a la generación siguiente. Para determinar si una quimera es capaz de transmitir la modificación genética, se debe cruzar la quimera con otro animal que no porte la misma modificación genética para establecer si la modificación deseada se transmite a la progenie resultante (F1). La detección de la modificación genética deseada en la progenie F1 del cruce entre la quimera y el otro animal establece que la quimera porta la modificación genética deseada en su línea germinal y es capaz de transmitir la modificación a su progenie (transmisión de la línea germinal). Típicamente, aproximadamente el 50 % de las quimeras exhiben transmisión por la línea germinal, El color del pelaje es el marcador que se emplea con más frecuencia del alcance de la contribución de la célula ES a la quimera y la transmisión del contenido genético de la célula ES a la progenie F1.

La actual necesidad de generar una generación F1 para determinar si la quimera es capaz de transmitir la modificación genética es ineficiente y costosa en términos de tiempo y de costes de cría y mantenimiento de la progenie F1. Se proporciona un método para mejorar la eficiencia del proceso para generar animales transgénicos mediante la presente invención la cual permite la introducción, en embriones en pre-mórula, de células que generan animales que tienen una contribución aumentada de material genético de las células exógenas en relación a los resultados obtenidos cuando las células donantes se introducen en embriones en estadios posteriores, por ejemplo, blastocistos. Como resultado, un porcentaje mucho mayor de los animales de F0 son transmisores de la línea germinal. En muchos casos los animales de F0 son transmisores al 100 % en la línea germinal y por tanto esos animales de F0 pueden transmitir los materiales de las células ES a toda su descendencia.

Introducir células donantes en embriones en estadios tempranos, por ejemplo, embriones de 8 células, proporciona varios beneficios importantes respecto de los métodos actuales, que enseñan el uso de embriones huésped en estadios posteriores, por ejemplo, blastocistos. Tal como se muestra en el Ejemplo 1 a continuación, el número de embriones en estadio temprano recolectados de una madre donante (por ejemplo, un ratón BL/6 hembra) es mayor que el número de embriones en estadios posteriores recolectados. Por tanto, se necesitan menos ratones hembra preñados como donantes, disminuyendo el coste de obtención y mantenimiento de ratones hembra preñados.

Además, tal como se muestra a continuación, las células donantes pueden introducirse en un número menor de embriones en estadios tempranos que en los embriones en estadios posteriores para generar el mismo número de animales quiméricos, reduciendo el tiempo y coste de introducción de células donantes en embriones, por ejemplo, cuando la introducción se efectúa mediante microinyección, la cantidad de tiempo empleada en las microinyecciones se reduce en gran medida.

La presente invención también permite cultivar el embrión huésped que contiene a la célula donante hasta estadios post-mórula, por ejemplo, hasta un estadio de blastocisto o un estadio de gástrula, antes introducirlos en una madre subrogada para la gestación. Ya que las condiciones de cultivo *in vitro* son más favorables para las células donantes que para el embrión huésped, el embrión resultante tiene un contenido mayor de células derivadas de las células donantes en comparación con el método mediante el cual el embrión huésped en estadio de mórula se introduce en una madre subrogada para la gestación.

Una mejora importante proporcionada por la presente invención es que el número de animales generados que son capaces de transmitir el ADN donante aumenta sustancialmente con el uso de embriones huésped en estadios tempranos, de tal forma que se elimina una generación entera de cría. Esto es una mejora práctica significativa con implicaciones comerciales importantes.

Un método conocido en la técnica que permite eliminar una generación entera de cría emplea embriones tetraplontes como receptores de las células donantes modificadas. Ya que las células tetraploides del embrión receptor son incapaces de contribuir a los tejidos del animal en desarrollo, los animales que nacen se derivan completamente de las células donantes modificadas. Si los animales resultantes no tienen una modificación genética que afecte a la fertilidad, serán capaces de transmitir la modificación genética deseada a su progenie tras el apareamiento. Este proceso es laborioso e ineficiente, produciendo una pequeña fracción de animales nacidos vivos únicamente a partir de líneas celulares ES híbridas. Las inyecciones de células bajo la zona pelúcida de los embriones diploides en estadio de pre-mórula producen una supervivencia aumentada y una generación de un

número mayor de animales vivos derivados completamente o prácticamente por completo de células ES. Se pueden obtener machos y hembras mediante este método.

El método de la invención puede aplicarse para introducir células ES endógamas en embriones receptores exógamos mediante microinyección.

Otras características de la invención serán evidentes en el transcurso de las siguientes descripciones de realizaciones ejemplares, las cuales se proporcionan a modo de ilustración de la invención y que no pretenden ser limitativas de la misma.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos habituales en la técnica ejemplos de cómo efectuar y emplear los métodos, composiciones y animales de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de la invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión respecto de los números empleados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero se pueden esperar algunas desviaciones experimentales como es conocido para un experto en la técnica. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados, y la presión es próxima a o la atmosférica.

#### Ejemplo 1. Generación de animales transmisores de la línea germinal

Los embriones para la inyección se obtuvieron a partir de cruzamientos naturales donde la mañana de la implantación se designó a los 0,5 días p.c (post coitus). Se recogieron los oviductos de las hembras implantadas 2,5 días p.c. y se irrigaron con medio de Dulbecco para recolectar embriones de 8 células. Los embriones se mantuvieron en este medio para su cultivo (en un incubador a 37 °C al 5 % de CO<sub>2</sub>) y para los procedimientos de microinyección.

La inyección de los embriones de 8 células se realizó empleando técnicas estándar de microinyección excepto en que antes de la introducción de células ES, se generó un agujero en la zona pelúcida del embrión de 8 células utilizando un sistema láser XYClone según las instrucciones del fabricante. La aguja de inyección se inserta a través de este agujero y se depositan entre 6 y 10 células ES en el espacio perivitelino.

Los embriones inyectados se transfirieron a una placa de cultivo con KSOM+AA y se cultivaron durante la noche hasta el estadio de blastocisto. Los embriones supervivientes se transfirieron como blastocistos a hembras subrogadas en la tarde del día siguiente (3,5 días p.c).

#### Ejemplo 2. Generación de un ratón “knock-out” homocigótico para DLL4

Tal como se describe anteriormente se microinyectaron células ES knock-out homólogas para DLL4 en un embrión de ratón de 8 células. Los embriones inyectados se cultivaron hasta el estadio de blastocisto y se transfirieron a una hembra subrogada para su gestación. Todos los embriones knock-out para DLL4 murieron durante la gestación. La causa de la muerte fue idéntica a la observada en embriones producidos mediante el cruzamiento convencional de ratones heterocigóticos. La observación de la ausencia de fenotipo nulo en DLL en la generación F0 evitó el cruzamiento de dos generaciones que normalmente se requiere para generar ratones con fenotipo nulo en DLL4.

#### Ejemplo 3. Generación de ratones con modificaciones genéticas de F0 altamente y totalmente derivados de células ES

Las células masculinas ES genéticamente modificadas de la F1 H4 se microinyectaron en embriones C57BL/6, tanto de 8 células como en blastocisto. Los embriones blastocísticos microinyectados se transfirieron a una hembra subrogada inmediatamente después de la inyección. Los embriones de 8 células microinyectados se cultivaron además en medio de cultivo KSOM+AA hasta el estadio de blastocisto y se transfirieron a una hembra subrogada para la gestación. Los porcentajes de contribución de las células ES se estimaron por el color del pelaje de los ratones macho de F0. Los resultados se resumen en la Tabla 1. Tal como se muestra, cuando las células ES modificadas genéticamente se microinyectaron en embriones de 8 células, todos los ratones de F0 se derivan de células ES. Por otro lado, cuando las células modificadas genéticamente se microinyectaron en embriones en estadio de blastocisto, ninguno de los machos de F0 se derivaron completamente de la células ES y solo aproximadamente la mitad de los ratones macho de F0 (2 de 4 y 4 de 7 para 494B-F5 Y 1218X-E2, respectivamente) tienen más del 90 % de células derivadas de células ES.

**Tabla 1**

| Línea celular ES | Embriones   |    | Número de crías |        | Nº de ratones macho de F0 con diversos porcentajes de contribución de células ES* |            |      |        |       |
|------------------|-------------|----|-----------------|--------|---|------------|------|--------|-------|
|                  | Estadio     | Nº | Total           | Machos | < 50%   | 50% al 80% | 90 % | > 90 % | 100 % |
| 494B-F5          | 8 células   | 33 | 11              | 11     | 0   | 0          | 0    | 0      | 11    |
| 494B-F5          | Blastocisto | 20 | 5               | 4      | 0   | 0          | 2    | 2      | 0     |
| 1218X-E2         | 8 células   | 50 | 6               | 6      | 0   | 0          | 0    | 0      | 6     |
| 1218X-E2         | Blastocisto | 36 | 7               | 4      | 0   | 0          | 0    | 4      | 0     |

\*Los porcentajes de contribución de células ES se estimaron por el color del pelaje de los ratones de F0.

5 Se emplearon más líneas celulares ES para ensayar el efecto del estadio del embrión huésped (8 células vs. blastocisto) sobre la contribución de la célula ES en el ratón macho de F0 resultante. Se obtuvieron resultados similares y se resumen en la Tabla 2 (\* Los porcentajes de contribución de células ES se estimaron mediante el color del pelaje de los ratones de F0).

**Tabla 2**

| Línea celular ES | Embriones   |     | Número de crías |        | Nº de ratones macho de F0 con diversos porcentajes de contribución de células ES* |            |      |        |       |
|------------------|-------------|-----|-----------------|--------|---|------------|------|--------|-------|
|                  | Estadio     | Nº  | Total           | Machos | < 50%   | 50% al 80% | 90 % | > 90 % | 100 % |
| F1H4 parental    | 8 células   | 120 | 34              | 30     | 3   | 0          | 0    | 0      | 27    |
| F1H4 parental    | Blastocisto | 125 | 24              | 20     | 5   | 1          | 2    | 12     | 0     |
| 609B-G2          | 8 células   | 50  | 17              | 15     | 2   | 0          | 0    | 0      | 13    |
| 609B-G2          | Blastocisto | 50  | 21              | 16     | 1   | 0          | 1    | 14     | 0     |
| 698B-A8          | 8 células   | 25  | 5               | 4      | 1   | 0          | 0    | 1      | 2     |
| 698B-A8          | Blastocisto | 25  | 9               | 6      | 3   | 3          | 0    | 0      | 0     |
| 639C-A9          | 8 células   | 37  | 12              | 11     | 1   | 0          | 0    | 0      | 10    |
| 639C-A9          | Blastocisto | 25  | 7               | 7      | 0   | 0          | 0    | 7      | 0     |
| 619A-A1          | 8 células   | 25  | 12              | 11     | 1   | 0          | 0    | 0      | 10    |
| 619A-A1          | Blastocisto | 25  | 7               | 6      | 0   | 0          | 0    | 6      | 0     |
| 576A-E11         | 8 células   | 25  | 12              | 10     | 1   | 0          | 0    | 0      | 9     |
| 576A-E11         | Blastocisto | 25  | 21              | 16     | 2   | 1          | 1    | 12     | 0     |

#### 10 **Ejemplo 4. Generación de ratones hembra de F0 elevadamente y completamente derivados de células ES**

Se microinyectaron células ES XO modificadas genéticamente (clon 648B-H12) en embriones C57BL/6 tanto en estadio de 8 células como de blastocisto. Los embriones blastocísticos microinyectados se transfirieron a una hembra subrogada para la gestación inmediatamente después de la inyección. Los embriones de 8 células microinyectados se cultivaron posteriormente en medio de cultivo KSOM+AA hasta el estadio de blastocisto y posteriormente se transfirieron a una hembra subrogada para la gestación. Los porcentajes de contribución de células ES en los ratones hembra de F0 se estimaron por el color de su pelaje. Como se muestra en la Tabla 3, cuando las células ES XO modificadas genéticamente se microinyectaron en embriones de 8 células, todas las quimeras fueron hembras. Cuando las células ES modificadas se microinyectaron en embriones en estadio de blastocisto, únicamente 7 ratones F0 de un total de 16 para 648B-H12 y 11 ratones de F0 de un total de 16 para 648C-H1 fueron hembras (\* El porcentaje de contribución de células ES se determinó por el color del pelaje de los ratones F0).

**Tabla 3**

| Clon XO  | Embriones SW |    | Crías | Nº de quimeras |       | Nº de ratones hembra de F0 con diversos porcentajes de contribución de células ES* |      |      |
|----------|--------------|----|-------|----------------|-------|--|------|------|
|          | Estadio      | Nº |       | Nº             | Total | Hembras  | <90% | >90% |
| 648B-H12 | 8 células    | 50 | 13    | 13             | 13    | 0  | 0    | 13   |
| 648B-H12 | Blastocisto  | 50 | 28    | 16             | 7     | 1  | 6    | 0    |
| 648C-H1  | 8 células    | 50 | 6     | 6              | 6     | 0  | 0    | 6    |
| 648C-H1  | Blastocisto  | 50 | 27    | 16             | 11    | 1  | 10   | 0    |

#### 25 **Ejemplo 5. Generación de ratones de F0 completa y totalmente derivados de células ES empleando embriones huésped endógamos y exógamos**

30 Se microinyectaron células ES masculinas endógamas (C57BL/6) o híbridas (F1 H4) en embriones Swiss Webster (SW) tanto en estadio de 8 células como estadio de blastocisto. Los embriones blastocísticos microinyectados se transfirieron a una hembra subrogada para la gestación inmediatamente después de la inyección. Los embriones de 8 células microinyectados se cultivaron posteriormente en medio de cultivo KSOM+AA hasta el estadio de blastocisto y se transfirieron a continuación a una hembra subrogada para la gestación. Los resultados se resumen en la Tabla 4 (\* Los porcentajes de contribución de células ES se estimaron por el color del pelaje de los ratones de F0).

**Tabla 4**

| Células ES | Embriones SW |     | Nº de crías |        | Nº de ratones macho F0 con diversos porcentajes de contribución de células ES* |      |      |
|------------|--------------|-----|-------------|--------|--|------|------|
|            | Estadio      | Nº  | Total       | Machos | <90%   | >90% | 100% |
| F1H4       | 8 células    | 140 | 46          | 46     | 34   | 4    | 8    |
| F1H4       | Blastocisto  | 50  | 11          | 11     | 11   | 0    | 0    |
| C57/BL6.2  | 8 células    | 75  | 19          | 6      | 0  | 0    | 6    |
| C57/BL6.2  | Blastocisto  | 10  | 7           | 6      | 6  | 0    | 0    |

Se obtuvieron resultados similares cuando se microinyectaron células ES masculinas endógamas 129 (CJ7) y Balb/c en embriones huésped endógamos C56BL/6 tanto en estadio de 8 células como de blastocisto. Los resultados se resumen en la Tabla 5 (\* Los porcentajes de contribución de células ES se estimaron por el color del pelaje de los ratones de F0).

**Tabla 5**

| Células ES | Embriones C56B/6 |    | Nº de crías |        | Nº de ratones macho de F0 con diversos porcentajes de contribución de células ES* |      |      |
|------------|------------------|----|-------------|--------|---|------|------|
|            | Estadio          | Nº | Total       | Machos | <90%  | >90% | 100% |
| 129 (CJ7)  | 8 células        | 57 | 8           | 8      | 3   | 0    | 5    |
| 129 (CJ7)  | Blastocisto      | 50 | 18          | 14     | 4   | 10   | 0    |
| Balb/c     | 8 células        | 50 | 11          | 11     | 5   | 0    | 6    |
| Balb/c     | Blastocisto      | 57 | 8           | 1      | 1   | 0    | 0    |

**Ejemplo 6. Los ratones de F0 altamente y totalmente derivados de células ES son competentes en la transmisión de la línea germinal**

Los ratones macho de F0 derivados de F1H4 que tenían más del 90 % de células derivadas de células ES (más del 90 % de contribución de células ES) se emplearon para ensayar la competencia de transmisión de la línea germinal. Empleando células ES masculinas, los ratones macho de F0 sexualmente maduros se cruzaron con hembras sexualmente maduras. El color del pelaje de la descendencia se empleó como marcador para evaluar la competencia de transmisión por la línea germinal. Los resultados se resumen en la Tabla 6. Cuando se emplearon embriones en estadio de 8 células como embriones huésped, más del 95 % (51 de 53) de los machos de F0 generados mediante microinyección en 8 células mostraron un 100 % de competencia de transmisión de la línea germinal. Cuando se emplearon embriones en estadio de blastocisto como embriones huésped, únicamente alrededor del 64 % (57 de 89) de los machos de F0 mostraron un 100 % de competencia de transmisión de la línea germinal. Además, aproximadamente el 21 % (19 de 89) de los machos de F0 generados por microinyección en blastocisto no produjeron ninguna descendencia en comparación con menos del 4 % (2 de 53) de los machos de F0 generados por microinyección en 8 células sin descendencia (\*\* Los porcentajes de competencia de transmisión de la línea germinal se estimaron por el color del pelaje de la descendencia correspondiente).

**Tabla 6**

| Estadio del embrión Huésped | Nº de machos de F0 criados | Nº de machos de F0 que mostraron varios porcentajes de competencia en la transmisión por la línea germinal** |         |      | Nº de machos de F0 sin descendencia |
|-----------------------------|----------------------------|--|---------|------|-------------------------------------|
|                             |                            | 100%   | Parcial | Cero |                                     |
| 8 células                   | 53                         | 51   | 0       | 0    | 2                                   |
| Blastocisto                 | 89                         | 57   | 9       | 4    | 19                                  |

**Ejemplo 7. Efecto del medio de cultivo post-microinyección en la calidad de los ratones de F0**

Se microinyectaron células masculinas de C57BL/6 y F1 H4 modificadas en embriones Swiss Webster (SW) en estadio de 8 células. Los embriones microinyectados se cultivaron en distintos medios de cultivo hasta el estadio de blastocisto y se transfirieron posteriormente a una hembra subrogada para la gestación. Se emplearon tres medios de cultivo distintos: (1) KSOM, medio de cultivo para embriones de ratón; (2) LIF, medio de cultivo para células ES que contiene LIF; (3) Wnt3, medio de cultivo para células ES condicionado con Wnt3. Los resultados se resumen en la Tabla 7. El medio para ES condicionado con Wnt3 se produjo de la siguiente forma: (i) se sembraron células L de ratón en un flask (frasco de Roux) T75 en un medio preparado con DMEM alto en glucosa, FBS 10 % y L-glutamina, y se incubaron a 37 °C, con CO<sub>2</sub> 5 %; (ii) cuando la densidad de células alcanzó una confluencia del 100 %, se resembró un 10 % de las células en otro flask T75; (iii) se recogió el medio de cultivo hasta que la densidad de células alcanzó de nuevo la confluencia (aproximadamente 3 días después de la resiembra); y finalmente, (iv) el medio de cultivo recogido se mezcló con un volumen igual de medio de cultivo para células ES sin LIF pero con sustitución de suero (\* los porcentajes de contribución de células ES se estimaron por el color del pelaje de los ratones de F0).

Tabla 7

| Células ES | Medio de cultivo | Nº de embriones transferidos | Nº de crías |        | Nº de ratones macho de F0 con diversos porcentajes de contribución de células ES* |      |
|------------|------------------|------------------------------|-------------|--------|---|------|
|            |                  |                              | Total       | Machos | <100%   | 100% |
| F1H4       | KSOM             | 140                          | 55          | 45     | 37  | 8    |
| F1H4       | LIF              | 40                           | 8           | 8      | 3   | 5    |
| F1H4       | Wnt3             | 40                           | 9           | 9      | 2   | 7    |
| C57BL/6.2  | KSOM             | 75                           | 16          | 16     | 10  | 6    |
| C57BL/6.2  | LIF              | 38                           | 10          | 10     | 5   | 5    |
| C57BL/6.2  | Wnt3             | 38                           | 11          | 11     | 0   | 11   |

Se obtuvieron resultados similares cuando se microinyectaron células de F1 H4 masculinas modificadas en embriones ES C57BL/6 de 8 células.

### 5 Ejemplo 8. Generación de animales homocigóticos para una modificación genética a partir de células ES heterocigóticas

10 Se microinyectan células ES masculinas heterocigóticas para una modificación genética deseada en un embrión de ratón de 8 células como se describe en el Ejemplo 1. Las células ES femeninas derivadas de las misma línea celular ES que las masculinas, y heterocigóticas para la misma modificación genética se microinyectan en otro embrión de ratón de 8 células como se describe anteriormente. Ambos embriones se cultivan hasta el estadio de blastocisto y se transfieren a una hembra subrogada para la gestación, Los machos y hembras resultantes de F0 transmisores de la línea germinal se cruzan para obtener progenie homocigótica para la modificación genética deseada. Se cruzan dos  
15 parejas de ratones. Nacieron un total de 39 crías y 9 de ellas eran homocigóticas para la modificación genética. Aspectos adicionales descritos en el presente documento:

A. Un método para generar un mamífero homocigoto para una modificación genética, que comprende:

- 20 (a) introducir una célula donante eucariota hembra en un embrión hospedador en estadio temprano, en el que la célula donante eucariota es una célula madre embrionaria (ES) o una célula de tipo ES heterocigota para la modificación genética;
- (b) cultivar el embrión de (a) hasta el estadio de blastocisto;
- 25 (c) introducir el embrión de (b) en una madre sustituta para gestación, en la que se genera un mamífero hembra modificado que tiene al menos 90 % de contribución celular de la célula donante hembra;
- (a') introducir una célula donante eucariota macho en un embrión hospedador en estadio temprano, en el que la célula donante eucariota es una célula madre embrionaria (ES) o una célula de tipo ES heterocigota para la modificación genética;
- (b') cultivar el embrión de (a') hasta el estadio de blastocisto;
- 30 (c') introducir el embrión de (b') en una madre sustituta para gestación, en la que se genera un mamífero macho modificado; y
- (d) reproducir un mamífero macho modificado sexualmente maduro y un mamífero hembra modificado sexualmente maduro de (c y c'), en el que se genera un mamífero homocigoto para la modificación genética.

35 B. El método del artículo A, en el que la célula donante eucariota hembra de la etapa (a) se obtiene de la misma línea celular de la célula donante eucariota macho de la etapa (a').

C. El método del artículo A, en el que la célula donante eucariota hembra de la etapa (a) es una célula XO y el mamífero hembra modificado de la etapa (c) es un mamífero XO.

40 D. El método del artículo A, en el que la célula es una célula ES de una cepa endógama o una cepa híbrida.

E. El método del artículo D, en el que la cepa endógama se selecciona del grupo que consiste en 129, C57BL/6 o BalbC.

45 F. El método del artículo D, en el que la cepa híbrida es C57BL/6x129.

G. El método del artículo A, en el que la célula modificada genéticamente se genera:

- 50 (a) obteniendo un fragmento genómico clonado grande que contiene una secuencia de ADN de interés;
- (b) usando recombinación homóloga bacteriana para modificar genéticamente el fragmento clonado grande de (a) para crear un vector de dirección grande para su uso en las células donantes eucariotas (LTVEC);
- (c) introduciendo las LTVEC de (b) en las células donantes eucariotas para modificar el gen endógeno o locus cromosómico en las células; y
- 55 (d) usando un ensayo cuantitativo para detectar la modificación del alelo en las células donantes eucariotas de (c) para identificar las células donantes en las que el gen endógeno o locus cromosómico se ha

modificado genéticamente.

- 5 H. El método del artículo A, en el que el embrión hospedador comprende un embrión endógamo de la cepa C57BL/6 o un embrión exogámico de la cepa Swiss Webster.
- I. El método del artículo A, en el que el cultivo de la etapa (b) y/o (b') está condicionado por un factor de crecimiento.
- 10 J. El método del artículo I, en el que el factor de crecimiento es una proteína de la familia Wnt.
- K. El método del artículo J, en el que la proteína de la familia Wnt es Wnt3a.
- L. El método del artículo A, en el que la célula donante eucariota se introduce en el embrión hospedador a través de una apertura en la zona pelúcida.
- 15 M. El método del artículo L, en el que la apertura se crea por un láser.
- N. Un método para generar un embrión homocigoto para una modificación genética, que comprende:
- 20 (a) introducir una célula donante eucariota hembra en un embrión hospedador en estadio temprano, en el que la célula donante eucariota hembra es heterocigota para la modificación genética;
- (b) cultivar el embrión de la etapa (a) hasta el estadio de blastocisto;
- (c) introducir el embrión de (b) en una madre sustituta para gestación, en la que se genera un mamífero hembra modificado que tiene al menos 90 % de contribución celular de la célula donante hembra:
- 25 (a') introducir una célula donante eucariota macho en un embrión hospedador en estadio temprano, en el que la célula donante eucariota es heterocigota para la modificación genética;
- (b') cultivar el embrión de la etapa (a') hasta el estadio de blastocisto;
- (c') introducir el embrión de (b') en una madre sustituta para gestación, en la que se genera un mamífero macho modificado; y
- 30 (d) reproducir un mamífero macho modificado sexualmente maduro y un mamífero hembra modificado sexualmente maduro de (c y c'), en el que se genera un embrión homocigoto para la modificación genética y en el que la célula donante eucariota homocigota para la modificación genética se genera por conversión génica, dirigiéndose a ambos alelos del mismo gen, o dirigiéndose a un gen ligado a X o Y en una célula ES macho.
- 35 O. Un medio de cultivo para mantener y/o cultivar un embrión en estadio temprano, en el que el medio de cultivo comprende un factor de crecimiento, en el que el embrión en estadio temprano es un estadio de premórula o un embrión de 8 células, el factor de crecimiento es una proteína de la familia Wnt seleccionado del grupo que
- 40 consiste en Wnt1, Wnt3a, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt4, Wnt5a, Wnt6, Wnt7a, Wnt7a, Wnt8a, Wnt9a, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11 y Wnt16.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para generar un embrión de ratón que comprende:
  - 5 (a) introducir una célula donante de ratón en un embrión de ratón huésped en pre-mórula, en donde las células donantes comprenden células ES o células tipo ES de un ratón endógamo, y
  - (b) cultivar el embrión de ratón huésped en pre-mórula de (a) hasta el estadio de blastocisto, en donde al menos el 90 % de las células de un ratón que se desarrolla a partir del blastocisto se derivan de las células donantes.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, que además comprende introducir el embrión de (b) en una madre ratón subrogada para la gestación.
- 15 3. El método de acuerdo con una reivindicación 1 o 2, en donde (i) al menos el 95 % de las células de un ratón que se desarrolla a partir del blastocisto se derivan de las células donantes, o (ii) al menos el 99 % de las células de un ratón que se desarrolla a partir del blastocisto se derivan de las células donantes.
- 20 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el embrión de ratón huésped en pre-mórula:
  - (i) es un embrión diploide; y/o
  - (ii) es procedente de una cepa endógama o una cepa exógama; y/o
  - (iii) es un embrión en estadio de 8 células; y/o
  - 25 (iv) comprende una zona pelúcida, y en donde las células donantes de ratón se introducen en el embrión huésped de ratón a través de una abertura en la zona pelúcida; de manera opcional en donde la abertura se crea mediante un láser.
- 30 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el cultivo de la etapa (b) se condiciona por un factor de crecimiento, opcionalmente una proteína de la familia de Wnt; preferentemente Wnt3a.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde las células donantes son células femeninas XO.
- 35 7. Un cultivo, que comprende:
  - a) un embrión en estadio de premórula de ratón quimérico diploide, en el que el embrión de ratón quimérico comprende una célula ES de ratón donante modificado genéticamente y en el que un ratón generado a partir del embrión de ratón quimérico tiene al menos 90 % de contribución celular de la célula ES donante;
  - 40 b) un primer componente que comprende un primer medio adecuado para cultivar una célula ES de ratón; y
  - c) un segundo componente que comprende un segundo medio que comprende Wnt 3 o Wnt3a producida por células L de ratón.
- 45 8. El cultivo de la reivindicación 7, en el que
  - (i) Wnt3 se expresa a partir de un gen de Wnt3 añadido de forma exógena en las células L de ratón;
  - (ii) Wnt3a se expresa a partir de un gen de Wnt3 añadido de forma exógena en las células L de ratón;
  - (iii) el segundo medio comprende DMEM alto en glucosa, FBS 10 % y L-glutamina;
  - (iv) el embrión en estadio de premórula de ratón quimérico diploide comprende una zona pelúcida y la célula ES de ratón donante se ha introducido en el embrión en estadio de premórula de ratón quimérico diploide a través de una apertura en la zona pelúcida; o
  - 50 (v) la célula ES de ratón es de una línea endógama.
- 55 9. Un método para realizar el cultivo de la reivindicación 7, que comprende:
  - a) sembrar en placas células L de ratón que expresan y secretan Wnt3 o Wnt3a en un medio adecuado para cultivar células L de ratón;
  - b) cultivar las células L de ratón de la etapa (a) hasta su confluencia;
  - c) recoger las células L de la etapa (b) y volver a sembrar aproximadamente 10 % de las células L recogidas y cultivar las células L que se han vuelto a sembrar en el medio adecuado para cultivar células L de ratón de la
  - 60 etapa (a) para producir un medio acondicionado por células L de ratón;
  - d) recoger el medio acondicionado de (c);
  - e) combinar el medio recogido de (d) con un volumen igual de un medio adecuado para cultivar una célula ES de ratón que comprende reemplazo de suero; y
  - f) cultivar un embrión en estadio de premórula de ratón quimérico diploide en el medio combinado de (e), en donde el embrión de ratón quimérico comprende una célula ES de ratón donante modificado genéticamente y en donde un ratón generado a partir del embrión de ratón quimérico tiene al menos 90 % de contribución celular de
  - 65

la célula ES donante.

10. El método de la reivindicación 9, en el que el embrión de ratón en estadio de premórula quimérico es un embrión de ratón en estadio de 8 células.

- 5
11. Un método para realizar un ratón a partir de una célula ES donante que comprende:
- 10
- (a) cultivar un embrión hospedador en estadio de premórula que comprende una célula ES donante de una cepa endógama en medio de cultivo hasta estadio de blastocisto en un medio, en el que el medio comprende
    - (i) un componente que comprende un medio adecuado para cultivar una célula ES de ratón; y
    - (ii) un componente que comprende un medio que comprende Wnt3 o Wnt3a producido por células L de ratón;
  - (b) transferir el embrión en estadio de blastocisto a una madre subrogada; y
  - (c) gestar el embrión en estadio de blastocisto en la madre subrogada,

15 en el que un ratón generado a partir del embrión en estadio de blastocisto tiene al menos 90 % de contribución celular de la célula ES donante.

- 20
12. El método de la reivindicación 11, en el que
- (i) Wnt3 se expresa a partir de un gen de Wnt3 añadido de forma exógena en las células L de ratón;
  - (ii) Wnt3a se expresa a partir de un gen de Wnt3a añadido de forma exógena en las células L de ratón; o
  - (iii) las células L de ratón expresan y secretan Wnt3 o Wnt3a.

- 25
13. Un método para realizar un ratón a partir de una célula ES donante que comprende:
- 30
- (a) cultivar un embrión hospedador en estadio de premórula que comprende una célula ES donante de una cepa endógama en medio de cultivo hasta estadio de blastocisto en un medio de cultivo de embrión;
  - (b) transferir el embrión en estadio de blastocisto a una madre subrogada; y
  - (c) gestar el embrión en estadio de blastocisto en la madre subrogada,

35 en el que un ratón generado a partir del embrión en estadio de blastocisto tiene al menos 90 % de contribución celular de la célula ES donante.

14. El método de la reivindicación 13, en el que el medio de cultivo de embrión es KSOM.